

## GÉNCSENDESÍTÉS TANULMÁNYOZÁSA ÚJ GENETIKAI ALAPANYAGOK LÉTREHOZÁSÁVAL

KONKOLY MARIANNA<sup>1,2</sup>, MIHÁLY RÓBERT<sup>2</sup>, MONOSTORI TAMÁS<sup>1</sup>, PAUK JÁNOS<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Szegedi Tudományegyetem Mezőgazdasági Kar, Hódmezővásárhely

<sup>2</sup>Gabonakutató Nonprofit Kft., Biotechnológia Osztály, Szeged

\*e-mail: janos.pauk@gabonakutato.hu

### ABSTRACT - Gene silencing studies via generation of new genetic resources

Non race-specific resistance against powdery mildew encoded by the mutant allele (*mlo*) of the *Mlo* gene of barley is well known. The general aim of our research program is to study a similar type of resistance in wheat, using post-transcriptional gene silencing. Biolistic transformation of the powdery mildew sensitive 'CY-45' spring wheat genotype and the first tests of the putative transgenic plants have been performed. To silence the *Mlo1* gene of wheat, transformation was carried out with a plasmid construction carrying *Mlo1* sequence both in sense and in antisense orientation. This pSTARLING-A vector was co-transformed with pAHC20 plasmid carrying the *bar* selective marker gene. Putative transgenic plants selected on PPT-containing medium were sprayed with 1% Finale 14 SL non-selective herbicide two weeks after transplantation to green house. Altogether 3650 immature embryos were bombarded and 106 plantlets (2.9%) were regenerated from all treatments. Based on PCR analyses performed with the 66 plants (1.8%) surviving herbicide spraying, 25 samples gave positive results for both the *bar* gene and the sense as well as antisense *Mlo1* sequences. Highest rate of positive samples (1.1%) was achieved if 4-4 µl of the plasmid solutions were used for coating of gold particles, suspended and plated in 84 µl absolute ethanol. The transformation rate of 0.69% achieved with the 25 independent transgenic lines can be considered as a good result in international level, too.

**Kulcsszavak:** búza, genetikai transzformáció, *mlo* rezisztencia, géncsenedesítés

**Keywords:** wheat, genetic transformation, *mlo* resistance, gene silencing

### BEVEZETÉS

A búza (*Triticum aestivum* L.) mikrobiális kórokozói nagy kárt okozó ellenségei az embernek (terméscsökkenés, toxinok, szermaradványok stb.), amelyek ellen hosszú idők óta különböző módon védekezünk. A molekuláris genetika fejlődése ennek a területnek is segítséget hozott, a rezisztenciagének elemzése, funkcionális tesztelése kapcsán.

Minden növény számos aktív védekezési mechanizmussal rendelkezik a kórokozók ellen. Az árpa (*Hordeum vulgare* L.) az *Mlo* gén recesszív mutáns allélja (*mlo*) által meghatározott liztharmat elleni rezisztenciája a papillaképződéssel van kapcsolatban, ami a sejtfal helyi megvastagodását jelenti. A papillákban különböző antimikrobiális hatású fenolok és hidrogén-peroxid halmozódik fel, ami kompatibilis kórokozó-gazdanövény kapcsolat esetén nem fordul elő (HÜCKELHOVEN ÉS MTSAI, 1999).

A géncsenedesítés jelenségét ugyan a növényekben fedezték fel (NAPOLI ÉS MTSAI, 1990), de állatokban és gombákban is megfigyelhető (FIRE, 1999; HAMMOND ÉS MTSAI, 2001). A megfigyelések alapján a géncsenedesítés két alaptípusa különböztethető meg. Létezik a transzkripciós géncsenedesítés (transcriptional gene silencing, TGS), amely gén-inaktiválás a transzkripció szintjén, azaz a célgénből nem keletkezik mRNS. Másik alaptípusa a poszttranszkripciós géncsenedesítés (posttranscriptional gene silencing, PTGS), gén inaktiválás a transzkripció (mRNS képződés) után, azaz a célgén-eredetű mRNS-ek citoplazmában fokozott mértékben lebomlanak.

A vírus indukálta géncsenedesítést (VIGS) a növényi sejtben replikálódó vírusok indukálják saját RNS genomjukkal szemben. Ha a vírus genomja idegen szekvencia elemet

is tartalmaz (amely homológ egy növényi endogén génnel) az endogén gén mRNS-e is szekvencia-specifikusan lebomlik és így az endogén gén hiányára jellemző fenotípus alakul ki a növényen. A VIGS ezen tulajdonsága lehetővé teszi, hogy a növények védekező mechanizmusát felhasználva ismeretlen funkciójú szekvenciákhoz funkciót rendeljünk, vagy adott funkciójú gének funkcióvesztésének hatását vizsgáljuk (BURGYÁN, 2006). Kooperációs partnerünk (MBK, Gödöllő) ezt a rendszert alkalmazva választotta ki a búza *Mlo* gén azon specifikus szekvenciáját, az *Mlo1* szekvenciát, mely vírus indukált géncsendesítés után jelentős lisztharmat rezisztenciát okozott a tesztelt búza növényeken (BURGYÁN ÉS MTSAI, nem publikált eredmények). Ezt a munkát folytattuk a stabil transzformációs géncsendesítési kísérleteinkkel.

Kísérletünkben CY-45 tavaszi búza genotípus genetikai módosításával foglalkoztunk: az *Mlo* gént próbáltuk elcsendesíteni búzában egy, az *Mlo1* szekvenciát szensz és antiszensz formában hordozó plazmidkonstrukció bejuttatásával. Az *mlo* gén árpában helyi sejtfalvastagodással reagál lisztharmat fellépés esetén. Mi ezt a rezisztenciát szeretnénk elérni poszttranszkripció géncsendesítéssel, gén-inaktiválással a transzkripció után.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

### Alapanyag, előkészítés

A transzformációnk alapanyagául a mexikói származású, de szövettenyésztési alkalmasságra hazánkban szelektált (FELFÖLDI ÉS PURNHAUSER, 1992), CY-45 tavaszi búza genotípust választottuk, amely igen érzékeny a lisztharmat kórokozóra nézve (CSÖSZ LÁSZLÓNÉ, szóbeli közlés). Az éretlen búzaszemeket a virágzástól számított 12-14. napon a kalászból kiemeltük, majd fertőtlenítettük (50% Hypo + Tween20). Az izolált embriókat Petri-csészékbe, D<sub>2</sub> indukciós táptalajra (MS alaptáptalaj 2 mg/l 2,4-D kiegészítéssel) helyeztük. A táptalajra helyezett éretlen embrió sejtei intenzíven osztódni kezdtek, így kaptuk a belövéskor már részben dedifferenciált kalluszokat. A génbelövés előtti előtenyésztés 5-7 napig tartott.

### Genetikai transzformáció

A transzformációt megelőző négy, illetve a belövés utáni húsz órás ozmotikus kezelés 63,75 g/l mannitollal kiegészített indukciós táptalajon (D2m) történt.

Búza növényeinkben az *Mlo1* szekvencia elhallgattatására kooperációs partnerünk speciális vektor molekulát, a pSTARLING-A konstrukciót hozta létre, mely szensz és antiszensz orientációban tartalmazza a búza genomjában elhallgattatni kívánt gén szekvenciáját (BURGYÁN JÓZSEF ÉS VÁRALLYAY ÉVA, nem publikált adatok). Mivel ez a speciális vektor molekulánk nem tartalmazott szelektálható marker gént, ezért együtt vittük be a *bar* gént hordozó, pAHC20 plazmiddal (CHRISTENSEN ÉS MTSAI, 1992.). A plazmid oldatokat és az etanolt különböző mennyiségi arányokban adagoltuk ki az egyes kísérletekben.

A részecskebelövést a BioRad® PDS 1000/He részecskebelövő berendezéssel végeztük.

### Növényregenerálás, szelekció

Egy nappal a transzformáció után a belőtt embriók D<sub>2</sub>MCu kallusz indukciós táptalajra kerültek, amely szénforrásként maltózt tartalmazott (szacharóz helyett), 10 µM CuSO<sub>4</sub> kiegészítéssel. Az inokulumokat ezen a táptalajon tartottuk sötétben, 10-14 napig, 24-25 °C-os termosztátban. Ezt követően a kalluszok egy normál méretű Petri-csészében lévő, hormonmentes D<sub>0</sub>Cu 5ppt (2% szacharóz, 10 µM CuSO<sub>4</sub> és 5 mg/l PPT kiegészítés)

regenerációs táptalajra kerültek, ahol két hétig voltak fényen, 24-25 °C-on. Majd újra regeneráló táptalajra kerültek 10 mg/l-re emelt PPT-vel (glufosinate ammonium), emelt dózissal  $\text{CuSO}_4$  nélkül, ahol két hétig voltak fényen, 24-25 °C-on.

Regenerált növényeinket (>2 cm) gyökereztető táptalajra (1/2 MS, 2 % szacharózzal és 20 mg/l PPT-vel), egyedi üvegcsövekbe helyeztük, 24-25 °C-on, fényen inkubáltuk.

A megfelelően meggyökeresedett növényeket közönséges (nem steril) talajba ültettük ki, zárt rendszerű üvegházi körülmények közé. A megfelelően fejlődő, megerősödött növényeket két hét után 1 %-os 'Finale 14 SL' gyomirtószerrel permetezzük és molekuláris módszerekkel (PCR) teszteltük.

## EREDMÉNYEK

### Éretlen embriókból történő növényregenerálás

Kísérletünk során a CY-45 tavaszi búza genotípusból izoláltunk éretlen embriókat, mert ez a legjobb alapanyaga a génbelövéses genetikai transzformációnak és különböző kórtani adatok alapján ez a genotípus érzékenynek bizonyult a lisztharmatra. Genotípusunknál sikerrel indukáltunk embriogén struktúrákat és regeneráltunk zöld növényeket.

Kísérletünk során összesen 3650 éretlen embriót izoláltunk  $\text{D}_2$  táptalajra. A kalluszosodás az embriók lerakása után 5-10 nappal megindult, így kaptuk a belövéshez a dedifferenciált kalluszokat. Petri-csészénként 25 embriót raktunk ki, és lőttünk be a két plazmid konstrukcióval. Az 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  koncentrációjú plazmid oldatokat különböző mennyiségben (3-3, 4-4 vagy 5-5  $\mu\text{l}$ ) adagoltuk az egyes kísérletekben (1. táblázat).

1. táblázat Az eredmények összefoglaló táblázata

BELOTT EMBRIÓ K (DB)	KEZELÉS (PLAZMID ARÁNY, ETANOL)	NÖVÉNYEK CSÖBEN		KIÜLTE- TETT NÖVÉNYEK		BAR <sup>+</sup>		MLO SZENSZ <sup>+</sup>		MLO ANTI- SZENSZ <sup>+</sup>	
		db	%	db	%	db	%	db	%	db	%
950	3-3 $\mu\text{l}$ 84 $\mu\text{l}$	103	10,84	14	1,47	6	0,63	6	0,63	6	0,63
925	5-5 $\mu\text{l}$ 84 $\mu\text{l}$	216	23,35	51	5,51	6	0,64	6	0,64	6	0,64
1000	4-4 $\mu\text{l}$ 84 $\mu\text{l}$	98	9,8	21	2,1	11	1,1	11	1,1	11	1,1
775	4-4 $\mu\text{l}$ 150 $\mu\text{l}$	290	37,42	20	2,58	2	0,25	2	0,25	2	0,25
<b>3650</b>		<b>707</b>	<b>19,36</b>	<b>106</b>	<b>2,90</b>	<b>25</b>	<b>0,68</b>	<b>25</b>	<b>0,68</b>	<b>25</b>	<b>0,68</b>

A belövést követően a kontroll, nem transzformált kalluszok a fokozatosan emelt koncentrációjú (5 ill. 10 mg/l) szelekciós ágens (PPT) hatására elhalványultak, fejlődést nem mutattak, majd elpusztultak. A génbevitelén átesett kalluszok egy része, amelyek genomjába nem integrálódott a transzgén, szintén elpusztult. Ezzel szemben azokon a kalluszokon, melyekbe sikeresen bejutott és expresszáldott a transzgén ott a regeneráció jelei mutatkoztak. A szelekciós idő előrehaladtával egyre jobban megerősödő hajtáskezdemények fejlődtek.

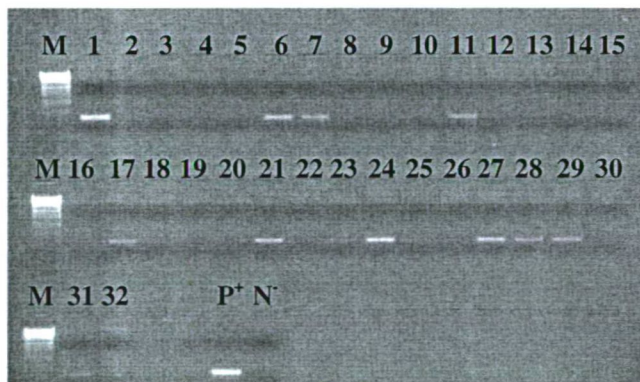
A regeneráció során 707 darab növénykét helyeztünk át egyedi növénynevelő csövekbe, ahol a szelekciót már 20 mg/l PPT-t alkalmazva végeztük. Ezzel éretlen embriókból kiindulva, sikeresen kialakítottuk, a PPT szelekción alapuló transzgénikus növény-előállítási modellt, amely kísérletünk alappillére volt.

A 1. táblázatból látható, hogy az embriók regeneráló képességét tekintve a 4-4 µl plazmid-oldattal bevont, 150 µl etanolban szuszpendált aranyrészecskés eljárás bizonyult a leghatékonyabbnak: itt a belőtt embriók 37,42%-a került egyedi növénynevelő csövekbe (2 cm felett). A legkevesbé sikeres regenerálást a 4-4 µl plazmiddal, 84 µl etanolos szuszpendálással végzett kísérletünk során tapasztaltuk: itt mindössze az embriók 9,8%-át tudtuk átrakni a növénynevelő csövekbe.

### Transzgénikus jelölt növények üvegházi kiültetése

Miután növényeink megfelelően erősödtek, meggyökeresedtek az *in vitro* szelektív körülmények között, talajba ültettük ki őket, zárt rendszerű üvegházi körülmények közé. Sikeresen regenerált növényeink száma 106, mely százalékos hatékonyságban kifejezve 2,9%. A leghatékonyabb növény-kiültetést az 5-5 µl plazmiddal bevont, 84 µl etanolban szuszpendált aranyrészecskék eredményezték (5,51%), míg a legkevesebb kiültetett növényt a 3-3 µl plazmid/84 µl etanollal végzett kísérletünkből kaptuk (1. táblázat). A megfelelően fejlődő, megerősödött növényeinket két hét eltelte után 1%-os Finale 14 SL gyomirtószerrel permetezzük le. A permetezést túlélő növényeink száma 66 (1,8%), elpusztult növényeink száma 40 (1,09%) volt (1. táblázat).

Egy hét elteltével a permetezést túlélő, zölden maradt növények DNS szintű tesztelését végeztük el. Kísérleteink célja a transzgénikus jelölt növények közül a valóban transzgénikusak azonosítása volt, a bevitt gének jelenlétének bizonyításával.



**3. ábra** Bar PCR, 1-32. minta

1. sor: marker (M); 1-15. minta, 2. sor: marker; 16-30. minta, 3. sor: marker; 31-32. minta; üres zseb; DNS nélküli minta; plazmid (P<sup>+</sup>); negatív növényi kontroll (N<sup>-</sup>)

### Transzgénikus jelölt növényeink molekuláris jellemzése

A transzformációs kísérletből származó 66 db (1,8%) transzgénikus jelölt növényből és a kontroll növényekből egyaránt levélmintát vettünk, majd genomi DNS-t izoláltunk. A kapott DNS mintákkal PCR vizsgálatot végeztünk a *bar*, illetve a szensz és antiszensz *MloI* szekvenciára nézve.

A 66 növényből 25 esetben kaptunk *bar* génre nézve pozitív eredményt, a szensz és antiszensz orientációjú szekvenciákra nézve szintén 25 minta bizonyult pozitívnak (1-2. ábra). Kiindulási anyagunk 3650 embrió volt, ez Petri-csészénként 25 db éretlen embriót jelentett. A belövést 775 embriónál 150 µl etanol hozzáadásával végeztük, melyhez 4-4 µl



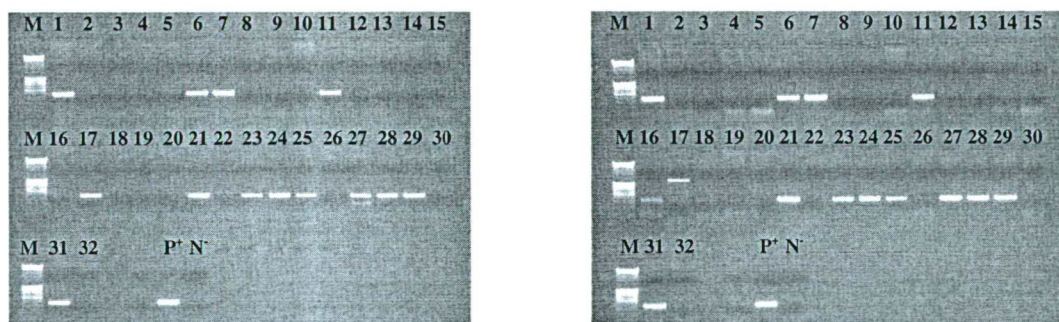
pSTARLING-A és pAHC20 plazmid molekulát adtunk. Ebből a sorozatból az 1. táblázatban is feltüntetett 66 mintából mindössze 2 (0,25%) minta bizonyult a *bar*, illetve a szensz és antiszensz *Mlo1* szekvenciára nézve pozitívnak. 950 embriónál a belövést 84 µl etanol hozzáadásával végeztük, melyhez 3-3 µl pSTARLING-A és pAHC20 plazmid molekulát adtunk. E kezelésnél összesen 6 (0,63%) minta lett pozitív a vizsgált génekre nézve. 925 embrió esetében 5-5 µl plazmid-oldatot adtunk, 84 µl etanollal. Ilyen feltételek mellett 6 (0,64%) minta bizonyult pozitívnak a vizsgált génekre nézve. Végül 1000 embrió belövését végeztük el 4-4 µl plazmid, illetve, 84 µl etanol hozzáadásával. Pozitív mintáink száma 11 db (1,1%) volt a bejuttatni kívánt génekre nézve.

A transzformációhoz használt etanol mennyiségek alapján megállapítottuk, hogy a 84 µl etanolban szuszpendált arany szemcsével végzett belövés jóval hatékonyabb, mint a 150 µl etanolban szuszpendált arany szemcsével végzett belövés, ahol a belőtt minták mindössze 0,25%-a volt pozitív (1. táblázat).

Összességében elmondható, hogy a 4-4 µl plazmid oldattal és 84 µl etanolban szuszpendált arany részecskékkel végzett kísérletünk volt a leghatékonyabb, 1,1%-ban (11 növényenél) értünk el pozitív eredményt az 1000 belőtt embrióra számítva (1. táblázat).

Az 1-32. vizsgált minta PCR-tesztjének eredményeit az 1-2. ábra mutatja.

Az 1. ábrán jól látható, hogy a *bar* gén esetében 13 minta mutatott pozitív eredményt. Ugyanezen növény mintákkal (1-32. minta) elvégeztük a PCR reakciót a szensz és antiszensz *Mlo1* szekvenciára tervezett primer párral is (2. ábra).



**2. ábra** *Mlo1* szensz (bal oldal) és *Mlo1* antiszensz (jobb oldal) PCR, 1-32. minta  
1. sor: marker; 1-15. minta, 2. sor: marker; 16-30. minta, 3. sor: marker; 31-32. minta; üres zseb; DNS nélküli minta; plazmid (P<sup>+</sup>); negatív növényi kontroll (N<sup>-</sup>).

A szensz és antiszensz *Mlo1* PCR-tesztjénél a 32 izolált DNS mintából 13 pozitív eredményt mutatott (2. ábra). Az *Mlo1* szensz esetében, a vizsgált minták közül a 27. dupla sávot mutat, *Mlo1* antiszensznél, a 17. minta esetén a vártnál nagyobb méretű fragmentet kaptunk. Ezek a minták *bar* génre vizsgálva viszont pozitív jelleget mutattak. A későbbiekben tervezett RNS szintű vizsgálatokkal tisztázzuk, van-e detektálható génexpresszió a transzformált növényeinkben. A gél-elektroforézist elvégeztük a 33-66. mintákkal is a vizsgált génekre nézve.

## MEGVITATÁS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérletünkben CY-45 tavaszi búza genotípus genetikai módosításával foglalkoztunk: célul tűztük ki az *Mlo1* génjének elcsendesítését búzában. Egy, az *Mlo1* szekvenciát szensz és antiszensz formában hordozó plazmid-konstrukció (pSTARLING-A) bejuttatásával, poszttranszkripcióis géncsendesítéssel kívántuk kialakítani a lisztharmat elleni rezisztenciát.

Mivel a kooperációs partnerünk által létrehozott plazmid molekula (pSTARLING-A) nem tartalmaz szelektálható marker gént, ezért azt a *bar* gént hordozó, pAHC20 plazmiddal együtt juttattuk be a génbelövés során. Hasonló kotranszformációval korábban már mások (VASIL ÉS MTSAI, 1992; BECKER ÉS MTSAI, 1994) és saját laboratóriumunk (PAUK ÉS MTSAI, 1998) is hozott létre transzgénikus növényeket.

A nemzetközi szakirodalomban már több, gyakorlatban is alkalmazható tesztrendszer ismertettek különböző kórokozók elleni rezisztenciában érdekelt gének genomikai szűrésére (DOUCHKOV ÉS MTSAI, 2005; IHLOW ÉS MTSAI, 2008). Eredményes stabil transzformációs kísérletekről is megjelentek az első, rezisztenciával kapcsolatos publikációk (ALTPETER ÉS MTSAI, 2005), mégis búzában mindeddig nem ismertek olyan stabil transzformációs eredmények, melyek az árpában ismert *Mlo* rezisztencia búzában való sikeres alkalmazásáról szólnak.

CY-45 búza genotípusunknál sikerrel indukáltunk embriogén struktúrákat és regeneráltunk gyökerező zöld növényeket. Célunk minél több, transzgént hordozó, zöld kallusz-kolónia előállítás volt. Azokat a növényeinket, melyek megfelelően növekedtek az üvegsőbe helyezést követően, kiültettük az üvegházba, számukra optimális körülményeket biztosítva a további fejlődéshez. Azoknál a növényeknél, ahol a gyökér és a hajtás fejlődése gátolva volt valamilyen oknál fogva, nem tudtuk kiültetni. A kiültetett növények közül az elpusztult (1,09%), illetve életben maradt (1,8%) növények arányát tekintve azonban megállapíthattuk, hogy a kapott eredményeink a nemzetközi szinten publikált 0,1-2,0%-os búza transzformációs eredmények fényében is jónak mondhatók (VARSHNEY ÉS ALTPETER, 2001). A PCR eredmények alapján rendellenes 17. és 27. növényi mintáinkat a többi növényvel együtt tovább vizsgáljuk génexpressziós szinten is, hogy megállapítsuk, van-e detektálható mennyiségű, géncsendesítésben jelentős siRNS?

A *bar*, *szensz* és *antiszensz Mlo1* szekvenciára nézve összesen 25 növényünk volt pozitív. A leghatékonyabb kezelésnek a 4-4 µl plazmid DNS-t, és 84 µl etanolos hígítást alkalmazó kotranszformáció bizonyult, itt hatékonysági százalékunk elérte az 1,1%-ot. Legkevésbé sikeres belövéses sorozatunkat a 4-4 µl DNS és 150 µl etanolos hígítás jelentette, ahol hatékonysági százalékunk mindössze 0,25%-ot ért el. A különböző hígítású és plazmid-arányú kotranszformációs kísérletek eredményeit mégsem értékelhetjük csupán a transzformációs hatékonyság alapján. A nagyobb hígítást alkalmazó, de kisebb hatékonyságú kísérleteink jelentősége teljes mértékben csak a génexpressziós vizsgálatok illetve a gének kópiaszámának meghatározása után mérhető. A kívánt géncsendesítés illetve rezisztencia eléréséhez feltételezéseink szerint nagy számú siRNS jelenlétére és egy, vagy alacsony beépült kópiaszámra van szükség.

Az előállított növények utódgenerációiban a jövőben teszteljük majd a bejuttatott gének öröklődését, illetve detektálhatjuk az együtt transzformált szelekciós marker gén és az *Mlo1* csendesítési konstrukció szegregációját vagy együtt öröklődését. Azokon a növényeken, melyek az üvegházban végzett eddigi kísérletek alapján transzgénikusnak bizonyultak, további molekuláris vizsgálatokat végzünk, a specifikus siRNS-ek jelenlétét és mennyiségét Northern hibridizációs próbával jellemezzük.

További feladatunk megvizsgálni, hogy a génmódosítás az utódgenerációkban okoz-e mérhető kórtani változásokat a kontroll növényekhez hasonlítva. Kísérleteink alap kutatás jellegűek. Szeretnénk megtudni, hogy a dolgozatban vázolt és létrehozott rendszerünk biztosít-e védekezési alternatívát a veszélyes gombabetegség, a lisztharmat ellen.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetüket fejezik ki, Dr. Burgyán József és Dr. Várallyay Éva (a gödöllői MBK munkatársai) együttműködéséért, a plazmid konstrukciók elkészítéséért és az MLO kutatás kezdeményezéséért. A kutatást a NAP-BIO2006ALAP3-0-1435/2006 kutatási project (német-magyar) támogatta.

## IRODALOMJEGYZÉK

- Altpeter, F. – Varshney, A. – Abderhalden, O. – Douchkov, D. – Sautter, C. – Kumlehn, J. – Dudler, R. – Schweizer, P. (2005): Stable expression of a defense-related gene in wheat epidermis under transcriptional control of a novel promoter confers pathogen resistance. *Plant Molecular Biology* 57: 271-283.
- Becker, D. – Brettschneider, R. – Lörz, H. (1994): Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *The Plant Journal* 5(2): 299-307.
- **Burgyán J (2006)**: Virus induced RNA silencing and suppression: defence and counter defence. *Journal of Plant Pathology* 88: 233-244.
- Christensen, A.H. – Sherrock, R.A. – Quail, P. (1992): Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689.
- Douchkov, D. – Nowara, D. – Zierold, U. – Schweizer, P. (2005): A high-throughput gene silencing system for the functional assessment of defense-related genes in barley epidermal cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 755- 761.
- Felföldi K. – Purnhauser L. (1992): Induction of regenerating callus cultures from immature embryos of 44 wheat and 3 triticale cultivars. *Cereal Res. Comm.* 20: 273-277.
- Fire, A. (1999): RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* 15: 358-363.
- Hammond, S. M. – Caudy, A. A. – Hannon, G. J. (2001): Post transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat. Rev. Genet.* 2: 110-119.
- Hükelhoven, R. – Fodor, J. – Preis, C. – Kogel, K. H. (1999): Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiol.* 119: 1251-1260.
- Ihlow, A. – Schweizer, P. – Seiffert, U. (2008): A high-throughput screening system for barley/powdery mildew interactions based on automated analysis of light micrographs. *Bmc Plant Biology* 8.
- Napoli, C. – Lemieux, C. – Jorgensen, R. (1990): Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in resersible cosuppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279-289.
- Pauk, J. – Hänsch, R. – Schwarz, G. – Nerlich, A. – Monostori, T. – Mészáros, A. – Jenes B. – Kertész Z. – Matuz J. – Schulze J. – Mendel R. R. (1998): Transzgénikus búza (*Triticum aestivum* L.) előállítása Magyarországon. *Növénytermelés* 47: 241-251.
- Varshney, A., Altpeter, F. (2001): Stable transformation and tissue culture response in current European winter wheats (*Triticum aestivum*, L.). *Mol. Breed.* 8: 295-309.
- Vasil, V. – Castillo, A. – Fromm, M. – Vasil, I. (1992): Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by micro-projectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology* 10: 667-674.